

●原 著

実験的 Endotoxin shock 時における肺傷害 — 活性酸素の意義と OHP の及ぼす効果について —

小島 範子* 宮下 正夫* 松田 健* 山本 達也*
 金 徳栄* 安倍 智* 千葉 和雄* 滝沢 隆雄*
 吉安 正行* 徳永 昭* 田中 宣威* 森山 雄吉*
 恩田 昌彦* 代田 明郎* 阿部 靖子**

Endotoxin-induced lung injury - The role of oxidants and the effect of OHP therapy.

Our previous study demonstrated the efficacy of OHP therapy to endotoxin shock in human and experimental animals. In order to elucidate the effects of OHP therapy to the lung injury induced by endotoxin injection in guinea pigs, antioxidants (superoxide dismutase and catalase) and malonaldehyde as a result of lipid peroxidation reaction in the lung tissue were biochemically evaluated with a correlation to histological changes.

Endotoxin injection induced prominent histological lung injury through oxidants released from leukocytes sequestered in the lung. Oxidant reactions were also observed in the animals exposed to OHP as long as 3 hours and resulted in histological changes characterized by edema. The endotoxin-injected animals with OHP therapy showed remarkable and prolonged oxidant reactions, and there were no significant histological differences between endotoxin-injected animals with and without OHP therapy.

From these results it is suggested that OHP therapy has a potential role for producing lung injury through augmented oxidant reactions in endotoxin shock. Thus OHP therapy should be carefully applied to the clinical use in patients with endotoxin shock.

結 言

高圧酸素療法は、患者を大気圧より高い圧力下におき、純酸素を吸入させることによって、血漿

中の溶存酸素分圧、さらに組織の酸素分圧を上昇させ、全身的または局所的な低酸素状態を改善することを目的とした治療法である。そこで shock に伴う急性循環不全による細胞の hypoxia, 細胞内代謝異常の改善に対する高圧酸素療法の有効性が注目され、さまざまなショック患者に臨床的応用がなされている。我々とはとくに治療上困難することの多いグラム陰性桿菌の endotoxin が血中へ出現し、増量することによって引き起こされる septic shock に対する本療法の治療効果について、従来より種々なる観点から研究報告してきた。一方、教室の金¹⁾らは endotoxin shock 時の肺傷害は、長時間におよぶ高圧酸素療法により逆に増悪することを超微形態学的に示した。このような観点から endotoxin shock 時の高圧酸素療法の肺におよぼす効果を知るために endotoxin を投与したモルモットに高圧酸素療法を施し、肺組織中の活性酸素の代謝について種々の検討を行った。すなわち、活性酸素の不均化酵素である superoxide dismutase (SOD), 産生された過酸化水素を分解する catalase などの antioxidant の活性をそれぞれ測定した。また oxidant によって生じる脂質の過酸化反応の最終産物である malonaldehyde (MDA) の変化を組織傷害の指標とし、さらに肺の組織学的検討も併せて行った。

材料および方法

体重200~250g, 雄モルモット84匹を endotoxin 投与群 (第1群, 35匹), 高圧酸素 (OHP) 治療群 (第2群, 18匹), endotoxin 投与—OHP 治療群 (第3群, 18匹) の3群に分類した。第1群においては LD50 である 0.7mg/kg の E.coli 0111

*日本医科大学第1外科

**日本医科大学第1生化学

endotoxin (Difco) をモルモットの腹腔内に投与した。第2群は絶対3気圧(3ATA)下のケージ内で純酸素を呼吸させた。第3群は第2群と同様に3ATAに達した時点で第1群と同量の endotoxin を腹腔内投与した。各群ともそれぞれ30分, 1時間, 3時間ごとに各6匹のモルモットを用い, 以下の方法にて検索を行った。なお対照として無処置モルモット13匹を用いて実験群と同様の検索を行った。

1. 白血球数の測定

ネブタール麻酔下で気管切開を行い気管カニューレを挿入した後, ただちに小動物用人工呼吸器(夏目製作所)を装着し呼吸を維持しながら, 胸骨正中切開にて開胸を行い, ただちに右房より採血し白血球数を測定した。

2. Superoxide dismutase 活性の測定

上述の方法で開胸摘出した肺組織1グラムを氷中で細切し, これに0.01M 燐酸緩衝液, pH7.2, 10mlを加え氷冷下にテフロンホモジェナイザーで十分ホモジェナイズした後, 30.000×gで30分間遠沈し, 上清を試料として用いた。酵素活性の測定はMarklundら²⁾の方法に準じて行った。Pyrogallol 0.75 μmol, 240 μmol. Tris-HCl. pH8.2を含む反応液2.5mlを用い, 自動化をBeckman Model 34Cを用いて420nmで測定し, これを50%阻害する酵素量を一単位とした。

3. Catalase 活性の測定

SOD活性の測定の手順に従い作製した試料を用いAebi³⁾の方法に従って240nmで比色定量した。酵素活性は下記の式によって求めた一次反応の速度恒数 k'/mg protein で表示した。

$$K' = \frac{2,303}{t} \cdot \log \frac{a}{(a-x)}$$

a : 初濃度

(a-x) : t分後の H₂O₂濃度

4. Malonaldehyde の測定

肺組織0.5グラムに0.01M 燐酸緩衝液, pH7.2, 2.5mlを加えて上記同様に作製した肺ホモジェネートに10%トリクロル酢酸2.5mlを加え10分間氷冷中に放置した後遠心し, その上清を試料とした。上清の一定量(4.5-5.0ml)に対し, 過飽和(約0.8%)チオバルビツール酸(TBA)溶液を同量加え, 10分間100℃で加熱した後530nmの吸光

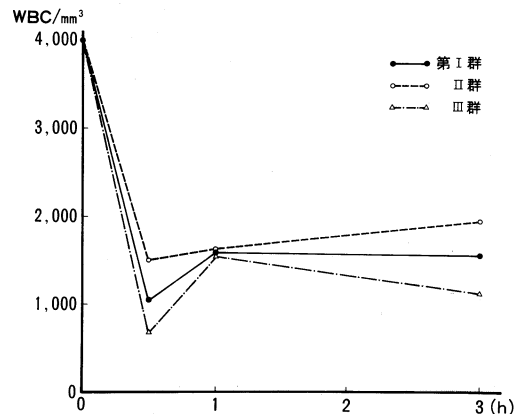


図1 各群の右房血中白血球数の消長

度を測定した。試料の呈色はTBA値を反映し, これをMDAのモル数に換算して表示した⁴⁾。

5. 肺組織学的観察

いずれの群においても各時間経過ごとに3匹のモルモットを肺組織学的観察に用いた。気管カニューレより20%ホルマリンを注入し, 数日間固定した後, 脱水後通常の方法でパラフィン包埋した。肺切片を作製しこれにHE染色を施した。

6. 蛋白質の定量

ウシ血清アルブミンを基準として, Lowryら⁵⁾の方法に従って測定した。

結 果

1. 右房血中の白血球数

各群における右房血中の白血球数の変動は図1に示したごとく, 対照群の4030±631/mm³に比し, 30分後ではいずれの群においても急激な白血球数の減少がみられた。すなわち第1群では1050±194/mm³, 第2群では1500±194mm³であり, とくにOHP下でendotoxinを投与した第3群においては880±104/mm³と他の2群に比べより白血球数減少が著明であった(P<0.01)。1時間後においては, 第1群で1663±387/mm³, 第2群で1740±327/mm³, 第3群で1675±108/mm³といずれの群も30分値より回復した。3時間後では第1群で1620±636/mm³, 第2群で1920±208/mm³, 第3群で1280±281/mm³と各群とも1時間値とほぼ同様の値を示した。

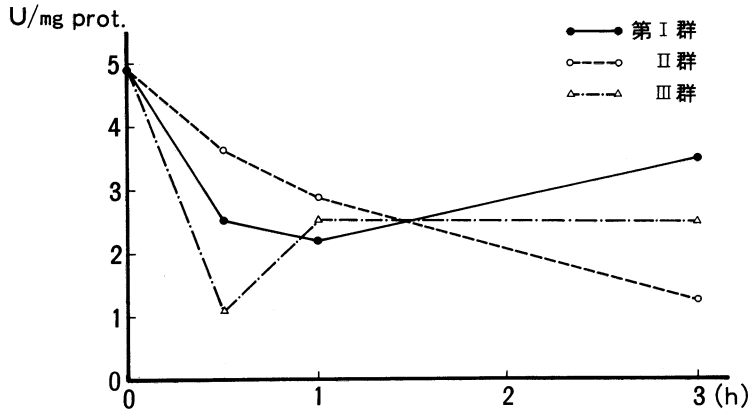


図2 各群の肺組織中のSOD活性値の変動

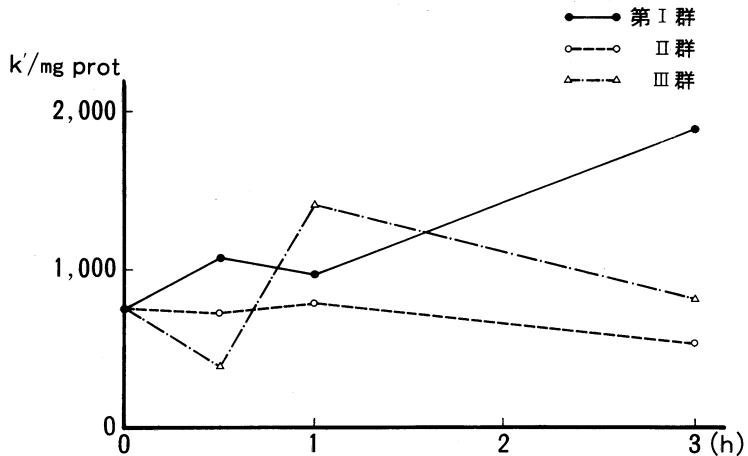


図3 各群の肺組織中のCatalase活性値の変動

2. 肺組織中のSOD活性

肺組織に含まれるSOD活性は図2に示したように対照群において $4.9 \pm 0.56 \text{ U/mg prot.}$ であったのに対し、第1群では30分で $2.5 \pm 0.24 \text{ U/mg prot.}$ 、1時間で $2.2 \pm 0.19 \text{ U/mg prot.}$ と減少したが3時間で $3.48 \pm 0.55 \text{ U/mg prot.}$ とやや回復の傾向を示した。第2群では30分で $3.65 \pm 0.30 \text{ U/mg prot.}$ 、1時間で $2.89 \pm 0.16 \text{ U/mg prot.}$ 、3時間で $1.25 \pm 0.08 \text{ U/mg prot.}$ とSOD活性は時間の経過とともに徐々に減少していった($P < 0.01$)。第3群では30分で $1.10 \pm 0.02 \text{ U/mg prot.}$ と最も低い活性値を示したが($P < 0.01$)、1時間では $2.54 \pm 0.11 \text{ U/mg prot.}$ と対照群のほぼ1/2の活性値まで回復した($P < 0.05$)。3時間においても $2.52 \pm 0.03 \text{ U/mg}$

prot. とほぼ同様の値をたもった($P < 0.02$)。

3. 肺組織中のcatalase活性

肺組織中のcatalase活性値は、対照群において $0.76 \pm 0.10 \text{ k'/mg prot.}$ であったのに対し第1群では $1.07 \pm 0.02 \text{ k'/mg prot.}$ を示し、3時間で $1.89 \pm 0.22 \text{ k'/mg prot.}$ と有意に増加した($P < 0.01$)。第2群でも30分で $0.73 \pm 0.08 \text{ k'/mg prot.}$ 、1時間で $0.79 \pm 0.08 \text{ k'/mg prot.}$ 、3時間で $0.53 \pm 0.10 \text{ k'/mg prot.}$ と以上3時間で大きな変動は認められなかった。一方、第3群においては30分で $0.39 \pm 0.02 \text{ k'/mg prot.}$ と対照群のほぼ1/2の活性に低下し($P < 0.05$)、1時間では逆に $1.41 \pm 0.32 \text{ k'/mg prot.}$ と対照群の約2倍の増加を来した。しかしながら3時間では対照群とほぼ同様の値、 $0.81 \pm 0.$

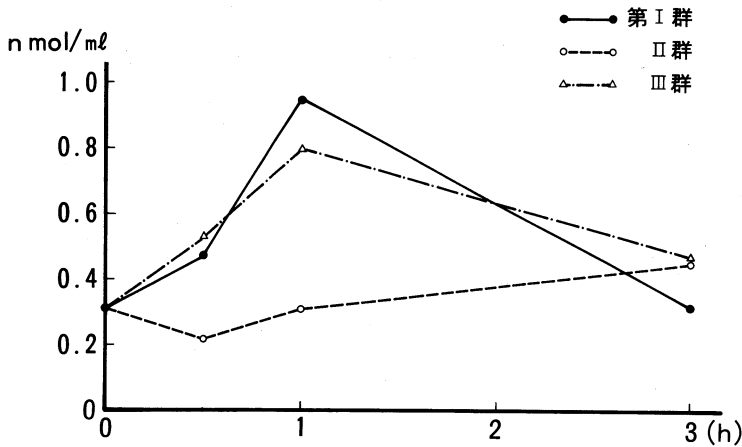


図4 各群の肺組織中のMDA値の変動

24k'/mg prot.に回復した(図3)。

4. 肺組織中のMDA値

対照群における肺組織中のMDA値は 0.31 ± 0.01 nmol/mlであった。第2群では30分で 0.22 ± 0.04 nmol/ml, 1時間で 0.31 ± 0.01 nmol/mlと大きな変動はみられなかったが, 3時間においてのみ 0.45 ± 0.04 nmol/mlと対照群に比べわずかな増加が認められた($P < 0.05$)。これに対し第1群, および第3群では1時間値においてほぼ同様に顕著な増加が得られた。すなわち第1群では30分で 0.47 ± 0.05 nmol/mlとわずかに増加し($P < 0.05$), 1時間で 0.95 ± 0.05 nmol/mlと対照群の約3倍値を示した($P < 0.01$)。第3群においても30分で 0.53 ± 0.06 nmol/ml, 1時間で 0.80 ± 0.01 nmol/mlと増加を示した($P < 0.001$)。3時間では両群とも低下し, 第1群は 0.32 ± 0.02 nmol/ml, 第3群は 0.47 ± 0.01 nmol/mlと有意に低下した($P < 0.001$)(図4)。

5. 肺の組織学的所見

対照群の肺組織像は軽度のうっ血および肺胞腔または間質内にわずかな顆粒球の浸潤を見るのみで, 浮腫や出血病巣は認められなかった。これに対し第1群では30分ですでにうっ血と血管周囲, 肺胞間質ならびに肺胞腔の浮腫が著明で顆粒球の浸潤も中等度に見られた。時間の経過と共にこれらの所見はさらに高度となり, 3時間の一部には肺胞腔にフィブリンの析出も認められた(図5)。第3群も第1群とほぼ同等の特徴的变化を呈して

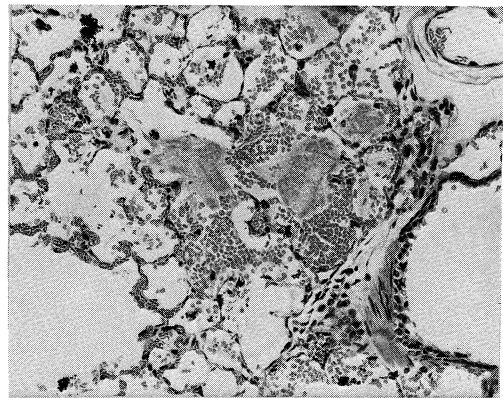


図5 Endotoxin投与後3時間の肺組織像

肺胞毛細血管の著しいうっ血と肺胞腔内の出血およびフィブリンの析出が認められる。さらに写真右上には血管周囲の浮腫とリンパ管の拡大もみられる。

H.E.染色, $\times 200$

いたが, 3時間では斑状の出血病巣も存在していた(図6)。第2群においては, 30分, 1時間で顆粒球の浸潤と浮腫性変化がごく軽度のみであった。しかしながら3時間でこれらはより顕著となり明らかに肺組織障害の存在を示していた(図7)。

考案

低酸素血症に基づく失調を改善させる目的でさまざまな疾患に対してOHP療法が用いられてい

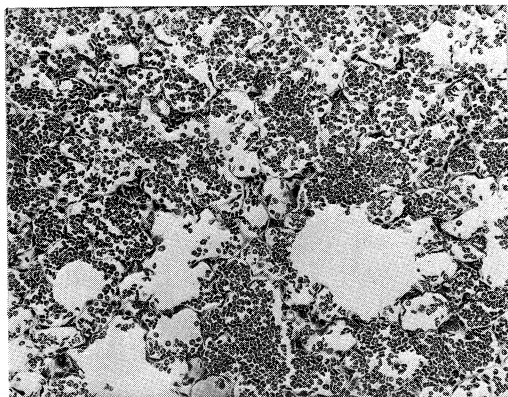


図6 Endotoxin 投与, OHP 処置群 3 時間の肺組織像
肺胞腔の著しい出血病巣を示す。
H.E.染色×200

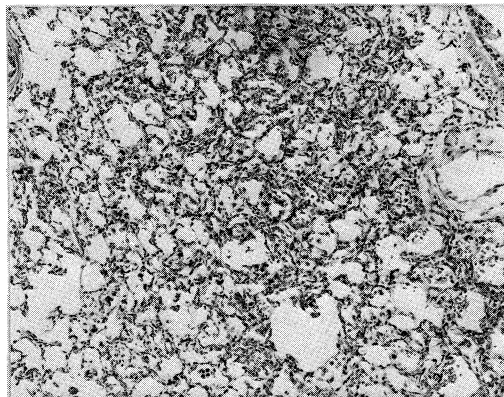


図7 OHP 処置群 3 時間の肺組織像
肺胞毛細血管のうっ血と肺胞壁ならびに脂胞腔の浮腫が著しく, さらに血管周囲の浮腫も認められる。
H.E.染色, ×100

る。とくに全身性低酸素状態が病態の中心をなす shock においては当初からその有用性がしばしば報告されてきた。教室の代田⁹⁾, 恩田ら⁷⁾も各種ショックに対する OHP 療法の効果について臨床的並びに実験的に研究してその有効性について報告している。

ところで, 腹部外科領域で最も問題となるのはグラム陰性桿菌由来の endotoxin による septic shock であり, このような重篤な病態では多くの場合治療がきわめて困難で, しばしば患者を死に至らしめる場合が少なくない。教室の吉安⁸⁾によれば, ショックを伴う重症腹膜炎患者に外科的治療を行うと共に, OHP 療法を施し75%の救命率が得られた。さらに endotoxin の致死的傷害作用に対する OHP 療法の効果を検討するために, マウスやウサギに endotoxin を投与し, 生存率の延長を認め, また肝, 腎, 副腎においても組織学的改善が得られたとも報告している。以上のように OHP 療法が endotoxin shock をはじめとする重症ショックの病態改善にきわめて有効である事実が報告されているが, 一方高濃度酸素が肺傷害をひきおこすことも知られており^{9)~11)}, 教室でも長時間におよぶ OHP 療法は逆に肺組織傷害を惹起することを超微形態学的に確認している¹¹⁾。この際, 高濃度酸素から遊離される活性酸素などの oxidant が肺傷害の発生に深く関与するとされている¹²⁾。さらに, endotoxin 投与後の肺傷害の発生メカニズムにも白血球由来の活性酸素が関与して

いることが報告されている¹³⁾。このような観点から OHP 療法が果たして endotoxin 投与時の肺傷害にどのような効果を及ぼすかについて検討を行った。Endotoxin 投与の第1群にみられた右房血中の白血球数の減少は, 肺, 肝などへの動員によるとされている¹⁴⁾。さらに気管支肺胞洗浄液の細胞分画でも白血球の出現頻度の増大することからも肺への動員が説明されている。また, OHP 療法を行った第3群においてもこの白血球数の減少がみられ, 第2群においても軽度ながらみられたことから OHP 療法自体, 白血球の肺組織内への動員をもたらすものと考えられた。肺組織中の SOD 活性は第1群では30分, 1時間値において著しい低値を示した。この傾向は第3群においても認められ, 特に30分値では最も低い値を示した。このような両群の急激な活性の低下に比較して第2群では時間の経過に従い, 活性が徐々に低下し, 3時間で最小となった。Symonyan¹⁵⁾によれば SOD 活性は多量の H_2O_2 によってその活性を失うとされ¹⁵⁾, また同時にこれは活性酸素 (O_2^-) の処理能力の低下を意味する。一方 catalase 活性については, 第2群には大きな変動はみられず, 第1群では3時間で著しい活性の増加がみられた。しかし第3群においては30分で著しく低下したが, 逆に1時間では最高値を示し, 3時間にてほぼ対照群と同様の値をとった。Oxidant による肺傷害は catalase 投与によって, 減弱化することが報告さ

れており¹⁶⁾¹⁷⁾, endotoxin 投与時さらに OHP 療法施行時にみられる oxidant の処理に本酵素が重要な役割を果たしていることが示唆される。

そこで oxidant による組織傷害時の指標として脂質の過酸化反応の最終産物である MDA が注目されている¹⁸⁾。第 1 群, 第 3 群の両群とも MDA は急激な増加を示し 1 時間で最高値に達した。第 1 群では 3 時間で対照群と同様の値に回復したが, 第 3 群ではなおわずかに増加していた。一方, OHP 処置のみの第 2 群においても 3 時間ではわずかな増加を示していた。すなわち endotoxin 投与により過酸化反応の増大が特徴的にみられたが, OHP 処置のみにおいても 3 時間で軽度増大することが確認された。

Till ら¹⁷⁾は oxidant が肺血管内皮細胞を傷害すると報告しているが, 今回の第 1 群にみられた浮腫などの著しい組織学的変化の発現には同部に浸潤した白血球に由来する oxidant が深く関与しているものと考えられる。また第 2 群においても 3 時間にて浮腫などの変化が明らかであったことから長時間に及ぶ OHP 療法自体も oxidant の放出によって肺障害を惹起せしめることが明かとなった。第 3 群でも第 1 群とほぼ同等の組織学的所見がみられたことから, 以上両群の機序をあわせもって肺障害の発生をみたものと考えられる。以上は従来より教室で報告してきたように, OHP 療法が endotoxin shock に有効である反面, 長時間におよぶと肺障害を助長するという事実を oxidant の反応ならびに肺組織学的に裏付けるものである。

結 語

1) Endotoxin 投与群である第 1 群では投与後 30 分から右房血中白血球の減少, SOD 活性の低下さらに 1 時間では脂質過酸化反応の亢進がみられた。さらに組織学的にも肺に白血球の浸潤, 浮腫をはじめとする著しい変化がみられることから肺障害の発生メカニズムには白血球由来の oxidant が関与していることが強く示唆された。

2) OHP 療法の第 2 群でも endotoxin 投与群と同様に血中白血球数の減少がみられたことから, 白血球が肺などの臓器へ動員された可能性が考えられる。従って oxidant は OHP によるものの他に, 白血球からも遊離される可能性が考えられた。

3 時間では oxidant による過酸化反応の増大が見られ, 同時に組織学的にも傷害が明らかであった。

3) Endotoxin 投与と共に OHP 療法を行うと SOD, catalase などの antioxidant 活性の変動が顕著で過酸化反応の増大も長期にわたり認められた。しかし組織学的変化は第 1 群とほぼ同様であった。以上の今回の実験的研究成績と教室における endotoxin shock 時の OHP 療法による生存率の向上性を考え合わせると, OHP 療法は shock 時の全身状態の改善に有効であるが, 一方では oxidant による肺傷害を更に助長する可能性も有していることが示唆され, 治療の実際に当たって十分に注意する必要があるものと考えられる。

〔参 考 文 献〕

- 1) 金徳栄, 星野正純, 滝沢隆雄, 吉安正行, 徳永昭, 関谷宗則, 田中宣威, 江上格, 森山雄吉, 山下精彦, 柴積, 吉岡正智, 恩田昌彦, 大川共一, 三樹勝, 代田明郎, 鈴木克哉, 相原薫, 矢島権八: Endotoxin shock 時の肺に及ぼす高圧酸素療法の影響。第 II 報—ことに肺胞被覆層の変化, 及び肺表面活性物質の動態を中心に, 日本高気圧医学会雑誌, 11: 84-86, 1976.
- 2) Marklund. S. and Marklund. G.: Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Auto-oxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. Eur. J. Biochem., 47: 469-474, 1974.
- 3) Aebi: Catalase. Methods Enzymatic Analysis. I: New York and London, Academic Press, 673-678, 1974.
- 4) Tappel, A.L. and Zalkin, H.: Lipid Peroxidation in Isolated Mitochondria. Arch. Biochem. Biophys., 80: 326-332, 1959.
- 5) Lowry. O.H., Rosebrough. N.J., Farr. A.L. and Raudall. R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 263-275, 1951.
- 6) 代田明郎: 高圧酸素療法の臨床経験とその治療効果について。日本医科大学雑誌, 38(6): 277-288, 1971.
- 7) 恩田昌彦, 埴原忠良, 森山雄吉, 滝沢隆雄, 徳永昭, 吉安正行, 山本保博, 江上格, 吉岡正智, 柴積, 山下精彦, 大川共一, 三樹勝, 代田明郎: 出血性ショックに対する高圧酸素療法の効果。日本高気圧環境医学会雑誌, 10: 9-12, 1975.
- 8) 吉安正行: 高圧酸素療法の臨床的応用とその治療効果に関する研究—とくに腹膜炎ショックとエンドトキシンショックを中心として—。日本臨床外

- 科医学会雑誌, 44(4): 376-387, 1983.
- 9) Bonikos,D.S., Bensch,K.G., Ludwin,S.K. and Northway,W.H.Jr.:Oxygen Toxicity in the Newborn The Effect of Prolonged 100 per Cent O Exposure on the Lung of Newborn Mice. Lab. Invest., 32(5): 619-635, 1975.
 - 10) Martin,W.J.II., Gadek,J.E., Hanninghake G. W. and Crystal,R.G.:Oxidant Injury of Lung Parenchymal Cell.J.Clin. Invest 68: 1277-1288, 1981.
 - 11) Gould .V.E., Tosco,R., Wheelis,R.F., Gould,N. S. and Kapanci,V.:Oxygen Pneumonitis in Man Ultrastructural Observations on the Development of Alveolar Lesions. Lab. Invest., 26 (5): 499-508, 1972.
 - 12) 山村秀夫: 酸素中毒とその防御機構, 医学のあゆみ, 119(9): 689-694, 1981.
 - 13) 宮下正夫, 松田健, 山本達也, 小島範子, 金徳栄, 森山雄吉, 恩田昌彦, 代田明郎, 川並汪一, 阿部靖子: 実験的 Endotoxin Shock 時における肺傷害-白血球の関与と活性酸素の意義について-。救急医学, 臨時増刊号: 280, 1984.
 - 14) Coalson,J.J., Benjamin,B.A., Archer,L.T., Beller,B.K., Spae R.H. and Hinshaw,L.B.: A pathologic study of escherichia coli shock in the baboon and the response to adrenocorticosteroid treatment. Surg. Gynecol. and obstet., 147: 726-735, 1978.
 - 15) Symonyan,M.A. and Nalbabdyan,R.M.: Interaction of hydrogen peroxide with superoxide dismutase from epythrocytes FEBS. Lett., 28(1): 22-24, 1972.
 - 16) Johnson,K.J. and Ward,P.A.: Role of oxygen metabolites in immune complex injury of lung.J. Immunol., 126(6): 2365-2369, 1981.
 - 17) Till,G.O., Johnson,K.J., Kunkel,R., Wand,P.A.: Intravascular Activation of Complement and Acute Lung Injury dependency on neutrophils and toxic oxygen metabolites. J.Clin. invest., 69: 1126-1135, 1982.
 - 18) Wong,C., Flynn,J., Demling,R.H.: Role of Oxygen Radicals in Endotoxin-Induced Lung Injury. Arch. Surg., 119: 77-82, 1984.

日本薬局方

抗ヘパリン剤

硫酸プロタミン注射液「シミズ」

10ml (100mg) 1瓶

日本薬局方

血液凝固阻止剤

ヘパリンナトリウム注射液「シミズ」

5ml × 10A · 10ml × 10V · 50ml × 10V · 100ml × 10V (1 ml = 1.000u)

- 健保適用
- 効能・効果・用法・用量, 使用上の注意は添付文書をご覧ください。

製造



清水製薬株式会社
静岡県清水市宮加三235番地

販売



武田薬品工業株式会社
大阪市東区道修町2丁目27番地